

2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007713066

WPI Acc No: 1988-346998/198849

XRAM Acc No: C88-153334

Biopolymers e.g. nucleic acids - chemical modification while selectively immobilised on an adsorbent

Patent Assignee: DIAGEN INST MOLEKUL (DIAG-N); DIAGEN INST MOLEKULARBIOLOGISC (DIAG-N)

Inventor: COLPAN M; PIOTROWIAK R

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3717210	A	19881201	DE 3717210	A	19870522	198849 B
DE 3717210	C2	19931125	DE 3717210	A	19870522	199347

Priority Applications (No Type Date): DE 3717210 A 19870522

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 3717210	A		4		
DE 3717210	C2		4	C07H-021/00	

Abstract (Basic): DE 3717210 A

In a new process for the modification of biopolymers (pref. charge-carrying biopolymers), (a) the biopolymers are selectively immobilised on an adsorbent, (b) the biopolymers are reacted in the adsorbed state, (c) the reaction products are further used if desired, and (d) the reaction products are desorbed from the adsorbent.

USE/ADVANTAGE - Modification of biopolymers such as nucleic acids with enzymes and biochemical reagents for biochemical or molecular biological purposes. The modification procedure is simple, and avoids expensive purification, separation and isolation procedures.

0/0

Title Terms: BIO; POLYMER; NUCLEIC; ACID; CHEMICAL; MODIFIED; SELECT; IMMOBILISE; ADSORB

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07H-021/00

International Patent Class (Additional): C07B-061/00; C07B-063/02; C07K-003/18; C12P-019/34; C12Q-001/68

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B04A1; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M720 M903 N134 N135 N153 Q230 V753 V802 V810

?

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 37 17 210 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 37 17 210.7
㉑ Anmeldetag: 22. 5. 87
㉒ Offenlegungstag: 1. 12. 88

(2)

⑤1 Int. Cl. 4:
C07 B 61/00
C 07 B 63/02
C 12 P 19/34
C 12 Q 1/68
C 07 K 3/18
C 07 H 21/00
// C12N 15/00,
C07K 17/00

Behördeneigenthum

DE 37 17 210 A1

⑦1 Anmelder:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

⑦4 Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,
J., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

⑦2 Erfinder:

Colpan, Metin, Dr., 4006 Erkrath, DE; Piotrowiak,
Ralf, Dr., 4010 Hilden, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur Modifizierung von Biopolymeren

Es wird ein Verfahren zur Modifizierung von Biopoly-
meren, insbesondere ladungstragenden Biopolymeren be-
schrieben, wobei die Biopolymeren
a) an einem Adsorbens selektiv immobilisiert,
b) im adsorbierten Zustand zur Reaktion gebracht,
c) danach gewünschtenfalls weiterverwendet und
d) die Reaktionsprodukte vom Adsorbens desorbiert wer-
den.

DE 37 17 210 A1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Modifizierung von Biopolymeren, insbesondere ladungstragenden Biopolymeren, wobei die Biopolymeren

- a) an einem Adsorbens selektiv immobilisiert,
- b) im adsorbierten Zustand zur Reaktion gebracht,
- c) danach gewünschtenfalls weiterverwendet und
- d) die Reaktionsprodukte vom Adsorbens desorbiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Adsorbens eine Matrix ist, wobei die Matrix oberflächlich mit chemischen Gruppen versehen ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix oberflächlich mit Ionenaustauschergruppen modifiziert ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Adsorbens eine poröse Matrix ist und/oder mit reaktiven Gruppen, welche zur Immobilisierung von Affinitätsliganden geeignet sind, modifiziert ist oder bereits mit gekoppelten Affinitätsliganden modifiziert ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierungsreaktion an einem Biopolymeren erfolgt, das an einem Ionenaustauscher mit niedriger Ladungsdichte immobilisiert ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierungsreaktion an einem Biopolymeren erfolgt, das an einem Ionenaustauscher mit hoher Ladungsdichte immobilisiert ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierungsreaktion an den Biopolymeren mittels Enzymen bewerkstelligt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Adsorbens in Form von Partikeln vorliegt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Adsorbens in Form sphärischer Partikel in flüssiger Phase aufgeschlämmt ist (Batch-Verfahren).

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die sphärischen Partikel auf einem flächigen Träger aufgebracht sind.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß immobilisierte Nukleinsäuren mit Restriktionsenzymen geschnitten werden.

12. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß an der immobilisierten Nukleinsäure eine partielle enzymatische Verdauung mit einem Restriktionsenzym durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß immobilisierte Nukleinsäuren mit nukleinsäure-modifizierenden Proteinen prozessiert werden.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifizierung von Biopolymeren, insbesondere ladungstragen-

den Biopolymeren.

Die Behandlung von Biopolymeren mit Enzymen und biochemischen Reagentien stellt eine zentrale Verfahrensweise in der Biochemie und der Praxis der Molekularbiologie dar. In biochemischen Laboratorien werden insbesondere Proteine und Nukleinsäuren modifiziert. Die dazu nötigen Reaktionen werden zu einem großen Teil in homogener, wäßriger Phase durchgeführt. Es sind auch Verfahren bekannt, bei denen das Substrat kovalent an eine feste Matrix gebunden und dann durch entsprechende Reagentien modifiziert wird. Um die modifizierten Biopolymere anschließend wieder von der festen Matrix zu lösen, sind weitere Reaktionsschritte erforderlich, insbesondere das Lösen von kovalenten Bindungen. Dabei sind Nebenreaktionen, die zu Ausbeuteverlusten führen, nicht zu vermeiden. Das an sich fortschrittliche und wertvolle Verfahren gemäß dem Stand der Technik wird dadurch allerdings in seiner Anwendungsbreite deutlich eingeschränkt, da beim Ablösen des Substrates von der Matrix auch in modifizierten Biopolymeren kovalente Bindungen aufgebrochen werden können, was nicht nur die Ausbeute beeinträchtigt, sondern auch zu Kontaminationen führt und somit aufwendige Reinigungs- und Trennverfahren notwendig macht.

Ähnlich liegen die Verhältnisse im molekularbiologischen Bereich, wo enzymatische Veränderungen von Biopolymeren, insbesondere Nukleinsäuren, eine dominierende Rolle spielen. Diese Reaktionen werden bisher lediglich in homogener Lösung durchgeführt.

Häufig ist es notwendig, enzymatische Reaktionen in aufeinanderfolgenden Schritten durchzuführen, wobei für jeden Schritt in der Regel eine andere gepufferte Lösung verwendet und das vorangehende Enzym entfernt werden muß. Bisher wurde daher zwischen diesen einzelnen Schritten die Reaktionslösung jeweils mit Phenol versetzt, zentrifugiert, mit Chloroform versetzt, erneut zentrifugiert und nach einer Ethanol-fällung wiederum zentrifugiert. Diese Schritte sind äußerst zeitaufwendig, führen zu Ausbeuteverlusten und erhöhen insgesamt die Zahl der möglichen Fehler- und Kontaminationsquellen. Es werden neben den enzymatischen Reaktionen auch Modifizierungen auf biochemischem Wege durchgeführt, wie beispielsweise Methylierungen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, das die Modifizierung von Biopolymeren, insbesondere ladungstragenden Biopolymeren, in universell anwendbarer, einfacher Weise ermöglicht, indem das Substrat nach der Reaktion ohne weitere chemische Reaktion, also mittels physikalischer Prozesse, weiterverwendet werden kann. Des weiteren soll das erfindungsgemäße Verfahren aufwendige Reinigungs-, Trenn- und Isolierungsverfahren überflüssig machen bei mehrstufigen Modifizierungsreaktionen mit Biopolymeren, insbesondere ladungstragenden Biopolymeren.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, wobei die zu modifizierenden Biopolymeren

- a) an einem Adsorbens selektiv immobilisiert,
- b) im adsorbierten Zustand zur Reaktion gebracht,
- c) danach gewünschtenfalls weiterverwendet und
- d) die Reaktionsprodukte vom Adsorbens desorbiert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Adsorbens vorzugsweise eine poröse Matrix, wobei die poröse Matrix oberflächlich mit chemischen Gruppen, insbe-

sondere Ionenaustauschern, Chelatbildnern oder Affinitätsliganden modifiziert ist. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Adsorbens mit reaktiven chemischen Gruppen modifiziert, wobei an die reaktiven chemischen Gruppen beispielsweise Affinitätsliganden gebunden werden können. Affinitätsliganden im Sinne dieser Erfindung sind Stoffe, die zu den zu modifizierenden Stoffen eine reversible, spezifische Wechselwirkung ausbilden und somit die zu modifizierenden Stoffe reversibel immobilisieren können. In der deutschen Patentanmeldung der Anmelderin P 36 39 949 wird ein Verfahren zur Trennung von langkettigen Nukleinsäuren unterschiedlichster Provenienz vorgeschlagen. Das dort eingesetzte Material ist eine oberflächlich modifizierte, partikuläre poröse Matrix, insbesondere auf Silicagelbasis mit einer Partikelgröße von 15 bis 250 µm und einer Porengröße von 100 bis 2500 nm (bekannt aus DE-OS 32 11 309 der Anmelderin).

Als Adsorbentien kommen ebenfalls Träger in Betracht, die mit Anionenaustauschern wie DE-52 Cellulose (Whatman, Katalog-Nr. 4057-050) oder Fractogel TSK DEAE-650 (Merck, Katalog-Nr. 14 989) beschichtet sind.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, daß an oben beschriebenen Materialien adsorbierte Polymeren modifiziert werden können. Es lassen sich beispielsweise endonukleolytische Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen, Polymerasereaktionen etc. an adsorptiv immobilisierten Nukleinsäuren durchführen. Wenn die Nukleinsäure im immobilisierten Zustand modifiziert wird, genügt das Entfernen der Lösung und einmaliges Waschen mit Puffer, bevor die folgende Enzymreaktion unter den entsprechenden neuen Pufferbedingungen stattfinden kann. Bei Verwendung von Ionenaustauschern zur Modifizierung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen wurde überraschenderweise gefunden, daß eine geringere Ladungsdichte des Ionenaustauschermaterials zu einer vollständigeren Verdauung (90 bis 95%) der Nukleinsäure führt. Benutzt man hingegen ein Ionenaustauschermaterial mit höherer Ladungsdichte, beispielsweise bekannt aus DE-OS 32 11 309 der Anmelderin, resultiert eine nur partielle enzymatische Verdauung der betreffenden Nukleinsäure.

Die Bereitstellung eines Verfahrens zur reproduzierbaren partiellen Verdauung von Nukleinsäuren ist eine weitere wertvolle Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens. Nach der bekannten Verfahrensweise von Smith und Birnstiel (Nucleic Acid Research 3, 2387, 1976) werden partielle Verdauungen von endmarkierten Fragmenten zur Kartierung von Restriktionsenzym-schnittstellen verwendet. Die partiellen Verdauungen müssen über Enzymkinetiken hergestellt werden, die vergleichsweise arbeitsintensiv sind. Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet die Möglichkeit, diese Methodik mit immobilisierter DNS durchzuführen, wobei die Erstellung von Kinetiken nicht erforderlich ist. Der notwendige Arbeitsaufwand wird dadurch auf etwa 1/10 des herkömmlichen beschränkt bei gleichzeitig hoher Reproduzierbarkeit und niedriger Fehleranfälligkeit in der Methodik. Derartige Kartierungen gehören zu den im molekulargenetischen Labor sehr häufig angewendeten Methoden und gewinnen auch in der Diagnostik an Bedeutung.

Die selektive Adsorption einer Gruppe von Biopolymeren ist einerseits von der Wahl des Adsorbens als auch andererseits von der Wahl der Bedingungen in der Lösung (Pufferbedingungen) abhängig. So kann bei-

spielsweise die zu modifizierende Nukleinsäure in Puffern mit niedriger Ionenstärke adsorbiert werden. Dabei werden, wie in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949 der Anmelderin vorgeschlagen, nur langkettige Nukleinsäuren adsorbiert. Sie können dann nach dem erfindungsgemäßen Verfahren modifiziert werden. Ganz allgemein läßt das erfindungsgemäße Verfahren aber auch die Prozessierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit Nukleinsäuren modifizierenden Proteinen zu.

Eine Desorption des modifizierten Biopolymeren erfolgt vorzugsweise durch Änderung der Pufferbedingungen (Ionenstärke, pH, kompetitive Liganden etc.). Es ist allerdings auch denkbar, daß insbesondere bei Verdauungsreaktionen eine Ablösung des Reaktionsproduktes stattfinden kann. In solchen Fällen kann sich die Desorption erübrigen.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Adsorbens zunächst mit einer Substanz belegt, welche eine Affinität zu den zu modifizierenden Biopolymeren besitzt, beispielsweise Protein A, das mit Immunglobulinen einen Komplex bildet, oder mono/polyklonale Antikörper, die dann ihrerseits im immobilisierten Zustand das korrespondierende Antigen binden.

Neben den enzymatischen Reaktionen können auch biochemische Veränderungen an den Biopolymeren in eleganter Weise ausgeführt werden. Auch hier wird zunächst das Biopolymere am Adsorbens immobilisiert. Dann werden die spezifischen Bedingungen der biochemischen Reaktion im einfachsten Fall durch Umpuffern (Pufferaustausch) eingestellt, woraufhin die entsprechende Reaktion durchgeführt wird. Es können so in geeigneter Weise Reaktionen wie Methylierungen, Seitenkettenmodifizierungen sowie die Einführung von radioaktiven Isotopen durchgeführt werden. Auch eine enzymatische Einführung radioaktiv markierter Komponenten ist an den immobilisierten Molekülen durchführbar. Nukleinsäuren können im adsorbierten Zustand, insbesondere gebunden an Ionenaustauscher, wie in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949 der Anmelderin vorgeschlagen, Fractogel TSK DEAE-650 und DE-52 Cellulose (Whatman) nach den üblichen Arbeitsanweisungen (siehe Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-136-0, New York) enzymatisch behandelt werden. Vor Zugabe des Enzyms empfiehlt es sich, mit Rinderserumalbumin (BSA) und dem später zu verwendenden Puffer eventuell verbliebene Bindungsstellen abzusättigen, so daß das anschließend hinzugesetzte Enzym nicht adsorbiert wird. Auf diese Weise lassen sich gängige Reaktionen der Nukleinsäurebiochemie durchführen, zum Beispiel restriktionsendonukleolytische Spaltungen von DNS, Polymerasereaktionen (einschließlich radioaktiver Markierungen wie Nicktranslation und Endmarkierungen mit Klenow-Polymerase), Methylierungen, Phosphatasebehandlungen etc. Überraschenderweise erlauben Anionenaustauscher mit niedriger Ladungsdichte eine fast vollständige Reaktion (90%), während Ionenaustauscher, die durch eine hohe Ladungsträgerdichte gekennzeichnet sind, lediglich partielle (50 bis 70%) Umsetzung gestatten.

Generell wird im Anschluß an die enzymatische Reaktion die jeweilige Lösung dekantiert und verworfen und dann mit einer Lösung, enthaltend 0,5 M Natriumchlorid, gewaschen. Wenn anschließend mit Wasser nachgewaschen wird, kann eine Enzymreaktion durchgeführt werden (zum Beispiel endonukleolytische Spal-

tung mit einem anderen Enzym, welches anderer Pufferbedingungen bedarf).

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich an festen Partikeln der porösen Matrix (Adsorbens) durchführen, wobei die Partikel entweder in wässriger Phase suspendiert (Batch-Verfahren) in Hohlräumen definierter Gestalt (Kartuschen) befindlich oder auf flächigen Trägern fixiert sind. Die letztere Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird in der gleichzeitig eingereichten, parallelen deutschen Patentanmeldung der Anmelderin vorgeschlagen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert. Die Modifizierung der Biopolymeren findet in den Beispielen in an flächige Träger fixierten Gefäßen statt. Selbstverständlich ist es auch möglich, mit dem sogenannten "Batch"-Verfahren zu arbeiten.

Bezugsbeispiel

Plasmidpräparation aus *Escherichia coli* Der Bakterienaufschluß erfolgt nach der Alkaline Lysis Method nach Maniatis et al. (1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-136-0, New York). Anstelle der Phenolisierung wird jedoch der Überstand auf 0,5 M Natriumchlorid eingestellt und in ein beschichtetes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Beschichtung des Eppendorf-Gefäßes geschieht wie folgt:

Zunächst wird Vestoplast-508 in Chloroform suspendiert (0,15 g/ml), so daß eine kolloidale Suspension entsteht. Diese Klebstoffsuspension wird in das Reaktionsgefäß gegeben und sofort wieder dekantiert. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen dem Matrixmaterial und dem Klebstoff verbleibt ein dünner Film an der Innenwandung des Gefäßes in einer etwa 20 µm dicken Schicht. Durch Unterdruck (5 Minuten im Exsikkator) wird anschließend das Chloroform entfernt. Die zu fixierenden Anionenaustauscher wie Fractogel TSK DEAE-650 oder wie die in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949 der Anmelderin vorgeschlagenen Materialien werden in das Gefäß gefüllt, welches anschließend auf 74°C erhitzt wird und dabei seine klebenden Eigenschaften entwickelt. Nach dem Abkühlen werden nicht fixierte Partikel des Anionenaustauschers mittels Druckluft durch Wegblasen entfernt. Nachdem der Bakterienaufschluß in ein auf diese Weise präpariertes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben wurde, wird die Lösung nach 15 Minuten Inkubationszeit dekantiert, das Reaktionsgefäß mit 2 × je 1 ml 0,5 M Natriumchloridlösung gewaschen und dann 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 µl Elutionspuffer (1,2 M Natriumchlorid, 4 M Harnstoff, 30 mM Natriumacetat, 15% Ethanol) eluiert. Das Eluat wird mit 25 µl Wasser und 80 µl Isopropanol versetzt, 20 Minuten bei -70°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die so isolierte Plasmid-DNS ist in ihrer Reinheit mit HPLC-gereinigter DNS vergleichbar und kann sämtlichen enzymatischen Behandlungen unterworfen werden.

Beispiel 1

Isolierung langkettiger, chromosomaler DNS aus Gewebe Ein Zellaufschluß eukaryotischer Zellen wird nach Maniatis et al. (1982, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-136-0, New York) durchgeführt. Sobald die Zellen lysiert sind, wird das grob gereinigte Lysat auf 0,5 M Natriumchlorid eingestellt und anschließend behandelt wie im Bezugsbeispiel beschrieben.

Je nach der Aufschlußmethodik können auf diese

Weise extrem große DNS-Fragmente (50 bis 1000 kb) isoliert werden.

Etwa 10 µg Gewebe (zum Beispiel Leber) werden in Mikrotiterplatten in 100 µl Daupuffer (4 M Harnstoff, 1% Triton, 10 mM EDTA, 100 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris, pH 8,0, 10 mM Dithiothreitol, 2 µg Proteinase K) 2 Stunden lang verdaut. Die Lösung wird mit 11 µl 5 M Natriumchlorid versetzt und anschließend in Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, die inwendig bis zu einer Höhe etwa 100 µl gemäß Bezugsbeispiel beschichtet sind. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten wird die Lösung dekantiert und das Reaktionsgefäß 2 × mit je 500 µl 0,5 M Natriumchlorid gewaschen. Die Elution der adsorbierten chromosomalen DNS erfolgt mit 100 µl Elutionspuffer (Bezugsbeispiel). Anschließend kann das Eluat gefällt und dann entsprechend weiterverarbeitet werden. Die mit dieser Methodik ermöglichte Gewinnung von Nukleinsäuren mit mehr als 1000 kb Größe ist interessant für Chromosomenkartierungen, die mit an seltenen Restriktionsstellen schneidenden Restriktionsendonukleasen wie Not I durchgeführt werden (im Rahmen des sogenannten Chromosome Walking mit anschließender Pulse-Field-Gelelektrophorese (PFG)). Eine andere Möglichkeit besteht darin, direkt, das heißt ohne Elution in der bereits beschriebenen Weise Restriktionsspaltungen durchzuführen.

Beispiel 2

3 µg Plasmid, pBR 322, die nach dem Bezugsbeispiel isoliert worden sind und an einem Anionenaustauscher immobilisiert wurden, werden mit Eco R1 endonukleolytisch gespalten. Hierzu wird zunächst eine Rinderserumalbuminlösung (2 mg/ml Eco R1 Puffer) in das Reaktionsgefäß gegeben, um verbliebene Bindungsstellen abzusättigen.

Nach 5 Minuten wird diese Lösung dekantiert und verworfen. Mit 3 Einheiten Eco R1 wird nun 30 Minuten in 100 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris, pH 7,5, 10 mM Magnesiumchlorid und 1 mM Dithiothreitol verdaut. Etwa 90 bis 95% der gesamten Plasmidspaltstellen ist verdaut, wie sich nach Elution mit anschließender Gelelektrophorese nachweisen läßt.

Beispiel 3

Anwendung zur Herstellung partieller Verdauungen für analytische, präparative und diagnostische Zwecke Eine partielle Verdauung von immobilisierten Nukleinsäuren mit Eco R1 wird wie in Beispiel 2 durchgeführt mit dem Unterschied, daß ein Ionenaustauschermaterial wie in der deutschen Patentanmeldung P 36 39 949 der Anmelderin vorgeschlagen wird. Dieses Ionenaustauschermaterial zeichnet sich durch eine hohe Ladungsträgerdichte aus. Gelelektrophoretische Analyse im Anschluß an die Desorption der Nukleinsäure vom Anionenaustauscher zeigt, daß nur ca. 60% der DNS-Spaltstellen verdaut wurden. Das gleiche Ergebnis kann auch mit Enzymen wie Hpa 2 nachvollzogen werden, die mehrere Restriktionsstellen aufweisen, also öfter schneiden.